

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05812

研究課題名(和文)脊椎動物におけるシアル酸の新規硫酸化酵素の探索・同定とその生物学的意義の解明

研究課題名(英文)The sialate sulfotransferase in vertebrates: Identification and significance

研究代表者

北島 健 (Kitajima, Ken)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：80192558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖付加はタンパク質や脂質の主要な修飾である。その糖鎖の最末端の糖残基は通常シアル酸が占めており、種々の重要な機能を担っている。しかし、そのシアル酸が更に硫酸化やアセチル化修飾される場合があることはあまり知られておらず、その修飾シアル酸の存在意義も明らかにされていない。本研究は、硫酸化に着目して、その生物学的意義の解明を目指した。その結果、シアル酸硫酸転移酵素の遺伝子を世界で初めて同定し、その2種類の酵素の局在、基質特異性を解明した。また、遺伝子ノックアウトメダカを作成し、それらが幼魚において致死となることを見出した。シアル酸の硫酸化が生存に重要な事象であることを初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、脊椎動物においてシアル酸の硫酸化が生存に対して根本的に重要であることを明らかにした。このことは、哺乳類では1981年に最初に硫酸化シアル酸の存在が発見されて以来、長期におよぶ生物学の謎であったその謎を解き明かしたことになりその学術的意義は大きい。また、本研究ではシアル酸の硫酸化を触媒する酵素とその遺伝子を同定した。ノックアウト動物の病的な表現型から、この酵素遺伝子の不全が原因となる病気が想定され、その探索や創薬的医療的応用への展開が可能になる点でも社会的意義が大きい。さらに、硫酸化シアル酸の性質解明を通じて、有用物質生産・材料利用などの応用領域に対するインパクトも期待できる。

研究成果の概要(英文)：Glycosylation is a major modification of proteins and lipids. The non-reducing termini are usually occupied by sialic acid residues to play various biological roles. However, very little have been known about the fact that the sialic acid residues are further modified by sulfation and acetylation. The significance of the modified sialic acids has not yet been clarified, either. This study sought to reveal the biological significance of the modified sialic acids, focusing on the sulfation. In this study, we for the first time identified two different sialate: O-sulfonyltransferase genes, and determined the intracellular localization and substrate specificity of the enzymes. In addition, we generated the gene-knockout medaka for the two genes, respectively, and found that they are lethal in their young fry. Taken together, we could first demonstrate that the sulfation of sialic acids is essential for the organism.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：硫酸化シアル酸 シアル酸 糖鎖 逆遺伝学 メダカ 酵素 硫酸転移酵素 遺伝子編集技術

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類を含む脊椎動物の細胞表面に存在する殆どのタンパク質と一部の脂質は糖質によって修飾されている。これらの糖質は、密集して細胞外表面にグリコカリクスと呼ばれる大きな体積を占め 100~200 nm にも及ぶ分厚い層を形成している。グリコカリクスは細胞特有の構造をもち、自己や外来細胞の認識や接着などの相互作用の場を提供している。殆ど全ての細胞において、グリコカリクスを構成するタンパク質や脂質由来の糖質 (以下、糖鎖) は分子重量 2~1000 kDa のオリゴ糖~多糖であり、その最末端にはシアル酸残基が存在している。したがって、シアル酸残基は細胞表面で起こるあらゆる事象に関わる重要な構造単位である。実際、免疫細胞の炎症部位への浸潤やリンパ系への回帰、インフルエンザウイルスの宿主細胞への接着など、シアル酸は必要不可欠である。また、シアル酸欠損動物が致死となること (Schwarzkopf et al, 2002 for mouse; Wu et al, in preparation for medaka) からシアル酸の存在自体がシアル酸をもつ生物の生存にとって重要であることは明白である。シアル酸の最大の特徴は、他の単糖にはない「構造多様性」である。シアル酸は骨格炭素 9 個からなる 2-ケト-3-デオキシノノン酸の総称名であり、生物界に広く存在する N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) の他に、炭素 5 位の置換基の違いで、N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、デアミノノイラミン酸 (Kdn) が存在する。とりわけ、それらがアセチル化、硫酸化、メチル化など様々な修飾を受け、単糖として 50 種類を超える桁外れの多様な分子種が存在する (図 1)。シアル酸がこのような構造多様性をもつことは、細胞表面の最先端で多種多様な現象に関与する分子としては、きわめて合目的である。しかし、シアル酸上の修飾基が存在する理由は実証されていないし、シアル酸残基上の修飾基の違いの意味も全く解明されていない。生体における細胞集団が多様な糖鎖認識抗体によって仕分け分類されるように、細胞は固有の表面糖鎖構造を持っており、糖鎖は「細胞の顔」と言われている。もし顔で例えるならば、シアル酸の有無は目つき鼻つきを表す「顔の個性」を演出し、シアル酸上の修飾基の有無はその個人の喜怒哀楽を表す「顔の表情」を演出する。つまり、細胞表面におけるシアル酸の存在は、例えば白血球の種類を規定するのに対して、O-アセチル化の有無は、その白血球細胞の活性化状態の違いを表すようなものであると考えられる。糖鎖修飾はタンパク質に親水性を付与して物性を変えたり、しばしば糖鎖認識レクチンタンパク質と結合したり、様々な細胞機能を制御することは今日広く認識されている。しかし、「糖鎖がさらに修飾されて何が起こるのか」という問いに対する解答は皆無に等しく、今後将来に亘って問い続けられる課題である。本研究は、シアル酸の修飾基に焦点を当ててこの課題に取り組み、その結果、糖鎖による細胞機能の制御機構の基礎から応用の新機軸が切り開かれるものと考えられる。また、修飾シアル酸の物性や生理学的効果の利用など、応用生物化学的視点からのポテンシャルは計り知れず、基礎から応用科学にいたる学術的意義はきわめて大きいと言える。

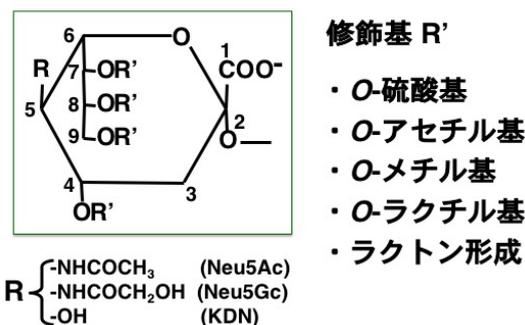


図1 シアル酸の構造多様性

### 2. 研究の目的

天然にはアセチル化、硫酸化、メチル化、ラクチル化、ラクトン形成などのシアル酸の修飾が知られているが、本研究は「硫酸化」に着目し、脊椎動物におけるシアル酸の硫酸化の生物学的意義を解明することを目標とする。硫酸化に着目する理由は、まず第1に、長期に及ぶ生物学の謎である点である。1981年胃粘膜糖脂質成分として硫酸化シアル酸が同定されて以来、40年間そのシアル酸特異的硫酸基転移酵素 (SulT-Sia) の実体は不明である。第2には、SulT-Sia の探索は我々独自の研究から派生している点である。第3には、硫酸化シアル酸が特徴的な存在分布をもつ点である。そこで本研究では、シアル酸硫酸転移酵素 (SulT-Sia) 遺伝子を同定し、その欠損等の効果を評価する。すなわち、(1) SulT-Sia 遺伝子の同定、(2) SulT-Sia の酵素学的性質の解明、(3) SulT-Sia 遺伝子のノックアウト動物の作出である。

### 3. 研究の方法

(1) シアル酸硫酸転移酵素 (SulT-Sia) 遺伝子の同定: ウニとマウス等の硫酸転移酵素の供与体基質 3'-phosphoadenosine 5'-phospho-sulfate (PAPS) 結合モチーフをもつ 200 種類に及ぶ遺伝子から可能性のある十数種類の遺伝子を選び、順次、クローニング後、遺伝子導入して 8-O-硫酸化シ

アル酸を認識するモノクローナル抗体 3G9 (Ohta et al 1999; Yamakawa et al. 2007) に陰性な哺乳類細胞を 3G9 陽性に変化させる遺伝子の探索を行う (方法 1)。また、3G9 陰性哺乳類細胞を種々の刺激薬剤や人為的突然変異誘導剤で処理して、3G9 陽性に変化する細胞を樹立し、RNAseq 法による mRNA 配列情報の獲得とサブトラクション法による 3G9 陽性細胞に特異的遺伝子群の同定とそこからの SulT-Sia 遺伝子の探索・同定を行う (方法 2)。

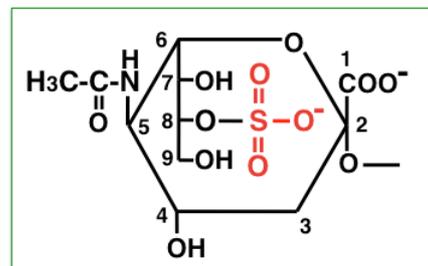


図2. 8-O-硫酸化シアル酸の構造

(2) SulT-Sia の酵素学的性質の解明: SulT-Sia の酵素反応は「Sia-R (受容体基質) + PAPS (供与体基質) → 8-O-硫酸-

Sia-R + PAP」である。(i)で同定した SulT-Sia 遺伝子について、酵素タンパク質を CHO 細胞などで合成・分泌させて組換え体タンパク質を取得する。そのタンパク質の活性を *in vitro* 反応系で確認する。また、受容体基質特異性 (シアル酸、CMP-シアル酸、シアロ糖鎖、糖タンパク質、糖脂質のいずれが受容体基質になるのか?) など酵素としての性質を明らかにする。酵素反応物の硫酸化シアル酸の検出には、3G9 を用いる免疫化学的方法に加えて、シアル酸特異的蛍光標識を行った後で、蛍光標識高速液体クロマトグラフィーで検出定量する化学的検出定量も行う。

(3) SulT-Sia 遺伝子欠損動物の作出: 3G9 抗体を用いた組織免疫学検索から、量的差異はあるものの、硫酸化シアル酸はヒトとマウスのほとんど全ての組織で発現していることを見出している。また、魚類メダカにも 3G9 エピトープが初期胚および成体臓器に検出される。そこで、まずは飼育や研究が安価で容易であるメダカを用いて、CRISPR-Cas9 遺伝子編集技術によってノックアウト個体を作成し、その表現型を Wu らの方法にしたがって観察する (Wu et al. 2021)。

#### 4. 研究成果

(1) SulT-Sia 遺伝子の同定: 方法 1 のデータベースから候補遺伝子を絞り込み、その遺伝子をクローニングして 3G9 抗体陰性細胞にトランスフェクションし、その細胞が 3G9 抗体陽性に転じるクローンを選んだ。その結果、最終的に 2 種類のシアル酸残基特異的硫酸化転移酵素 (SulT-Sia) 遺伝子、SulT-Sia1 と SulT-Sia2 をマウスで同定することができた。これらの遺伝子は、いずれも広く哺乳類からウニに至るまでの動物において保存されていた。

この実験の途上で、抗生物質 G418 耐性を指標にしたスクリーニングを行った際に、細胞を G418 処理するだけで細胞表面に硫酸化シアル酸残基の発現が誘導されるという現象を見出した。この G418 による誘導酵素の発現は G418 に対するネオマイシン耐性遺伝子の発現は不要であったため、細胞が G418 刺激に応答して誘導される酵素が存在しており、それが細胞表面に硫酸化シアル酸を誘導する G418 誘導性酵素の存在を示唆することができた。この新奇の硫酸化酵素の存在を示唆する結果について詳細に解析し、細胞密度の変化でも硫酸化の程度がダイナミックに変化する現象を見出すことができた。これらの研究成果は、データを整理して学術雑誌への発表を行った (Ertunc et al. 2020)。

(2) SulT-Sia の酵素学的性質の解明: 2 種類の SulT-Sia1 と SulT-Sia2 の組換え体酵素を培養細胞で発現させ、種々の糖脂質および糖タンパク質を基質として基質特異性を決定した。哺乳類細胞で発現させた組換え体 SulT-Sia1 は脂質上のシアル酸残基に硫酸基を転移したのに対して、SulT-Sia2 は脂質を基質としなかった。一方、SulT-Sia2 は糖タンパク質基質の N グリカン糖鎖上のシアル酸残基には硫酸基を転移したのに対して、SulT-Sia1 はこの糖タンパク質に対しては硫酸基を転移しなかった。このように 2 種類のシアル酸硫酸化転移酵素の基質特異性が異なることがわかった。また、両者の細胞内局在性を哺乳類細胞にトランスフェクションして調べたところ、共に Golgi 体に局在することがわかった。シアル酸転移反応が Golgi 体で行われることが知られていることから、シアル酸転移からその硫酸化までは Golgi 体内で効率的に起こることが示唆される。

(3) SulT-Sia 遺伝子欠損動物の作出: メダカを用いて 2 種類の SulT-Sia 遺伝子のそれぞれ単独のノックアウト動物の作製に成功した。興味深いことに、いずれの遺伝子のノックアウトメダカも、成魚になる前の幼魚の段階で致死となることがわかり、系統の維持はヘテロ個体を用いて行う必要があることがわかった。また、それぞれのノックアウトメダカが致死となる時期が異なることから、その致死性の原因を探った。その結果、ノックアウトメダカの表現型は特徴的であり、1 種類については心臓の異常が、もう 1 種類については成長異常がみとめられた。これらの結果は、上記(1)および(2)の結果と併せて投稿論文として投稿、軽微な改訂でアクセプトされる予定 (Ertunc et al. 2022)。

その他、本研究と関連して、CRISPR-Cas9 遺伝子編集技術によってノックアウト個体を作成する基礎的技術の開発を行い公表した (Wu et al. 2021)。また、関連するシアル酸代謝酵素の性質を調査する研究でも成果を発表した (Wu et al. 2022)。

<引用文献>

- Ertunc N, Sato C, Kitajima K. (2020) Sialic acid sulfation is induced by the antibiotic treatment in mammalian cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 84(11):2311-18.
- Schwarzkopf M, Knobloch KP, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, Lucka L, Horak I, Reutter W, Horstkorte R. (2002) Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 5267-70.
- Ertunc N, Phitak T, Wu D, Fujita H, Hane M, Sato C, Kitajima K. (2022) Sulfation of sialic acid is ubiquitous and essential for vertebrate development. *Scientific Reports.* in press.
- Ohta K, Sato C, Matsuda T, Toriyama M, Lennarz WJ, Kitajima K. (1999) Isolation and characterization of low density detergent-insoluble membrane (LD-DIM) fraction from sea urchin sperm. *Biochem Biophys Res Commun* **258**, 616-23.
- Wu D, Arakawa H, Fujita A, Hashimoto H, Hibi M, Naruse K, Kamei Y, Sato C, Kitajima K. (2021) A point-mutation in the C-domain of CMP-sialic acid synthetase leads to lethality of medaka due to protein insolubility. *Scientific Reports.* 11: 23211.
- Wu D, Gilormini PA, Toda S, Biot C, Lion C, Guérardel Y, Sato C, Kitajima K. (2022) A novel C-domain-dependent inhibition of the rainbow trout CMP-sialic acid synthetase activity by CMP-deaminoneuraminic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 617:16-21. (doi: 10.1016/j.bbrc.2022.05.031).
- Yamakawa N, Sato C, Miyata S, Maehashi E, Toriyama M, Sato N, Furuhashi K, Kitajima K. (2007) Development of sensitive chemical and immunochemical methods for detecting sulfated sialic acids and their application to glycoconjugates from sea urchin sperm and eggs. *Biochimie* **89**, 1396-1408.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nursah Ertunc, Chihiro Sato, Ken Kitajima	4. 巻 84
2. 論文標題 Sialic acid sulfation is induced by the antibiotic treatment in mammalian cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2311-2318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1792763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nursah Ertunc, Thanyaluck Phitak, Di Wu, Hiroshi Fujita, Masaya Hane, Chihiro Sato, Ken Kitajima	4. 巻 12
2. 論文標題 Sulfation of sialic acid is ubiquitous and essential for vertebrate development.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Di Wu, Hiromu Arakawa, Akiko Fujita, Hisashi Hashimoto, Masahiko Hibi, Kiyoshi Naruse, Yoshihiro Kamei, Chihiro Sato, Ken Kitajima	4. 巻 11
2. 論文標題 A point-mutation in the C-domain of CMP-sialic acid synthetase leads to lethality of medaka due to protein insolubility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01715-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Di Wu, Pierre-Andre Gilormini, Sakura Toda, Christophe Biot, Cedric Lion, Yann Guerardel, Chihiro Sato, Ken Kitajima	4. 巻 617
2. 論文標題 A novel C-domain-dependent inhibition of the rainbow trout CMP-sialic acid synthetase activity by CMP-deaminoneuraminic acid.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 16-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.05.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ken Kitajima, Nursah Ertunc, Chihiro Sato
2. 発表標題 The expression of sulfated sialic acids (SiaS) is dynamically regulated in mammalian cells
3. 学会等名 Society for Glycobiology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ertunc Nursah, 佐藤ちひろ, 北島健
2. 発表標題 哺乳類細胞表面シアル酸の硫酸化は抗生物質G418によって発現誘導される
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nursah Ertunc, Thanyaluck Phitak, 藤田洋, 佐藤ちひろ, 北島健
2. 発表標題 脊椎動物における硫酸化シアル酸の存在、生合成および生物学的重要性の解明
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------